

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 11 月 8 日 (08.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/83817 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/68, C12N 15/09, G01N 33/50
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/03572
- (22) 国際出願日: 2001 年 4 月 25 日 (25.04.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-132667 2000 年 5 月 1 日 (01.05.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 栄研化学株式会社 (EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒113-8408 東京都文京区本郷1-33-8 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森 安義 (MORI, Yasuyoshi) [JP/JP]; 長嶺憲太郎 (NAGAMINE, Kentaro) [JP/JP]; 〒324-0036 栃木県大田原市下石上1381-3 栄研化学株式会社 那須工場内 Tochigi (JP).
- (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD FOR DETECTING PRODUCT OF NUCLEIC ACID SYNTHESIZING REACTION

(54) 発明の名称: 核酸合成反応産物の検出方法

(57) Abstract: A method for detecting the occurrence of a nucleic acid synthesizing reaction in a synthetic reaction for a nucleic acid using an enzyme, which comprises utilizing an insoluble substance formed in the synthetic reaction as an indication.

(57) 要約:

酵素を用いた核酸の合成反応において、生成する不溶性物質を指標として核酸合成の有無を検出する方法。

WO 01/83817 A1

明 細 書

核酸合成反応産物の検出方法

技術分野

本発明は、核酸増幅の有無を検出する方法に関する。

背景技術

核酸塩基配列の相補性に基づく分析方法は、遺伝的な特徴を直接的に分析することが可能である。そのため、当該分析方法は遺伝的疾患、癌化、微生物の識別等には非常に有力な手段である。また、遺伝子そのものを検出対象とするために、例えば培養のような時間と手間のかかる操作を省略できる場合もある。

しかしながら、試料中に存在する目的の遺伝子量が少ない場合の検出は一般に容易ではなく、標的遺伝子そのものを、あるいは検出シグナル等を増幅することが必要となる。

核酸増幅反応において、増幅の有無を検出する最も一般的な方法は、増幅反応後の溶液をアガロースゲル電気泳動にかけ、エチジウムブロマイド等の蛍光インターカレーターを増幅産物に結合させて特異的な蛍光を観察するというものである。他のDNAが混在するおそれがなく、増幅産物の有無のみを知りたい場合には、電気泳動を省略して増幅反応後の溶液に蛍光インターカレーターを加えて蛍光を観察することも可能である。これらの方法は簡便であるが、蛍光を観察するためのUVランプと暗室が必要である。

蛍光色素をはじめとする各種標識物質で標識したプライマーやヌクレオチドを用いて増幅反応を行い、増幅産物に取り込まれた標識を観察する方法もあるが、増幅産物に取り込まれなかったフリーの標識プライマー（あるいはヌクレオチド）を分離する操作が必要であり、反応液量が微量である遺伝子増幅反応には適さない。また、標識プライマーやヌクレオチドは高価である。

発明の開示

本発明は、核酸増幅の有無を検出する方法を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、核酸増幅反応に伴い生成する不溶性物質を指標とすることにより、簡便且つ高感度に核酸増幅の有無を検出し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、酵素を用いた核酸の合成反応において、生成する不溶性物質を指標として核酸合成の有無を検出する方法である。さらに、本発明は、ポリヌクレオチド鎖上の標的領域を増幅し、増幅反応に伴い生成する不溶性物質を指標として核酸増幅の有無を検出する方法である。前記不溶性物質を指標とする検出は、濁度の測定又は沈殿の検出によるものであり得る。濁度の測定又は沈殿の検出は、凝集剤（例えば、ポリアクリル酸、カルボキシメチルデキストラン）を加えて行うものであり得る。

増幅方法としては、以下の工程：

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c、第2の任意配列F2c及び第3の任意配列F3cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第4の任意配列R1、第5の任意配列R2及び第6の任意配列R3をそれぞれ選択し、

(b) 前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、前記F3cに対し相補的な配列F3を含むプライマー、前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマー、並びに前記R3と同一の配列を含むプライマーをそれぞれ調製し、

(c) 前記ヌクレオチド鎖を鋳型として、鎖置換型ポリメラーゼ、前記プライマー、基質及び緩衝液の存在下でDNA合成反応を行うこと、
により行われるものが挙げられる。上記方法をLAMP法（Loop mediated isothermal amplification）という。

また、上記LAMP法とは別の態様のLAMP法、すなわち以下の工程：

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c及び第2の任意配列F2cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第3の任意

配列R1及び第4の任意配列R2をそれぞれ選択し、

(b) 前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、並びに前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマーをそれぞれ調製し、

(c) 前記ヌクレオチド鎖を増幅用鋳型として、鎖置換型ポリメラーゼ、前記プライマー、基質及び緩衝液の存在下でDNA合成反応を行うこと、
により増幅することもできる。

前記工程(c)のDNA合成反応は、融解温度調整剤（例えば、ベタイン、トリメチルアミンN-オキシド、プロリン、ジメチルスルホキシド、ホルムアミド）の存在下で行われ得る。

さらに、本発明は、ポリヌクレオチド鎖上の標的領域を増幅し、増幅反応に伴い生成する不溶性物質を経時的に検出することを特徴とする核酸増幅反応のモニタリング方法である。増幅は、例えば前記LAMP法により行うことができる。

さらに、本発明は、以下の要素を含む核酸増幅の有無の検出用又は核酸増幅反応のモニタリング用キットである。

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c、第2の任意配列F2c及び第3の任意配列F3cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第4の任意配列R1、第5の任意配列R2及び第6の任意配列R3をそれぞれ選択した場合、前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、前記F3cに対し相補的な配列F3を含むプライマー、前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマー、並びに前記R3と同一の配列を含むプライマー、

(b) 鎖置換型の相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼ、

(c) 要素(b)の基質となるヌクレオチド、

(d) 融解温度調整剤（例えば、ベタイン、トリメチルアミンN-オキシド、プロリン、ジメチルスルホキシド、ホルムアミド）、並びに

(e) 凝集剤（例えば、ポリアクリル酸、カルボキシメチルデキストラン）、

さらに、本発明は、以下の要素を含む核酸増幅の有無の検出又は核酸増幅反応のモニタリング用キットである。

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c及び第2の任意配列F2cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第3の任意配列R1及び第4の任意配列R2をそれぞれ選択した場合、前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、並びに前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマー、

(b) 鎖置換型の相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼ、

(c) 要素(b)の基質となるヌクレオチド、

(d) 融解温度調整剤（例えば、ベタイン、トリメチルアミンN-オキシド、プロリン、ジメチルスルホキシド、ホルムアミド）、並びに

(e) 凝集剤（例えば、ポリアクリル酸、カルボキシメチルデキストラン）

なお、本発明に用いるプライマーを構成する塩基配列の特徴付けのために用いられる同一、あるいは相補的という用語は、いずれも完全に同一、あるいは完全に相補的であることを意味しない。すなわち、ある配列と同一とは、ある配列に対してアニールすることができる塩基配列に対して相補的な配列をも含むことができる。他方、相補的とは、ストリンジェントな条件下でアニールすることができ、相補鎖合成の起点を提供することができる配列を意味する。本発明において、同一とは、塩基配列の相同性が、例えば90%以上、通常95%以上、より好ましくは98%以上であることをいう。また、相補的とは、相補配列と同一の塩基配列を意味する。すなわち、相補配列に対して、塩基配列の相同性が、例えば90%以上、通常95%以上、より好ましくは98%以上であるときに相補的といえることができる。なお、相補的な塩基配列は、それが相補鎖合成の起点として機能するときに、その3'末端の少なくとも1塩基が、相補配列に完全に一致することが望ましい。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、ポリヌクレオチド鎖上の標的領域を合成又は増幅した後、合成反応又は増幅反応に伴い生成する不溶性物質の存在を検出し、核酸増幅の有無を関連づけ

ることを特徴とするものである。

1. 検出対象

本発明の検出対象は、水に不溶性のピロリン酸塩の全てである。ピロリン酸はヌクレオチドが核酸鎖の末端に取り込まれる際に生成する。なお、本明細書中において「ピロリン酸」と「ピロリン酸イオン」とは同義として使用される。ピロリン酸と不溶性の塩を形成する物質のうち、マグネシウムイオンはポリメラーゼに必須であるので、ピロリン酸マグネシウムはこの検出に好適である。ピロリン酸マグネシウム以外のピロリン酸塩を検出対象とする場合は、ピロリン酸と不溶性の塩を形成させるための物質の添加方法に工夫が必要である。すなわち、ポリメラーゼに対して阻害効果を持たないかあるいは阻害効果が弱い物質は、増幅前に予め添加しておくことが可能である。また、ポリメラーゼを強く阻害する物質でも、阻害効果を現さない程度に少量であれば、同様に増幅前に添加しておくことが可能である。ポリメラーゼを強く阻害する物質を多量に添加したい場合は、それを増幅後の反応液に添加することによって同様の検出を行うことができる、このようなピロリン酸マグネシウム以外の検出対象としては、ピロリン酸カルシウム、ピロリン酸バリウム、ピロリン酸鉛等が挙げられる。

本発明においてポリヌクレオチドとは、増幅の対象となる核酸を意味し、一般的にはDNAとRNAの双方を含む。核酸は、一般に生物学的な試料に含まれる。生物学的試料とは、動物、植物又は微生物の組織、細胞、培養物若しくは排泄物、又はそれらの抽出物を意味する。また、生物学的試料には、ウイルスやマイコプラズマのような細胞内寄生体のゲノムDNA、あるいはRNAが含まれる。また、核酸は、前記生物学的試料に含まれる核酸から誘導されたものであってもよい。たとえば、mRNAをもとに合成されたcDNAや、生物学的試料に由来する核酸をもとに増幅された核酸などが挙げられる。

2. 酵素を用いた核酸の合成反応

酵素による核酸の合成反応において、酵素により核酸の末端にヌクレオチドを付加する過程でピロリン酸が生成する場合がある。本発明は、このような核酸の合成反応で生成されたピロリン酸を指標として核酸増幅の有無を検出することができる。

上記酵素としては、以下のものが挙げられる。

E.coli DNA ポリメラーゼ

Taq DNA ポリメラーゼ

T4 DNA ポリメラーゼ

逆転写酵素 (Reverse Transcriptase)

SP6 RNA ポリメラーゼ

T7 RNA ポリメラーゼ

ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ

Poly(A) ポリメラーゼ

Bst DNAポリメラーゼ

Vent DNAポリメラーゼ

各酵素の反応は、公知の任意の条件で行うことができる (T. Maniatis 他、Molecular cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。

3. 増幅反応

本発明の検出対象である不溶性物質がピロリン酸塩であることから、本発明において採用できる増幅反応は、ヌクレオチドが核酸鎖に取り込まれる際にピロリン酸が生成する反応であれば、どのようなものでもかまわない。また、ポリメラーゼも特に限定されるものではない。例えばポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のほか、LAMP法と呼ばれる増幅法、SDA (Strand Displacement Amplification) 法(特公平7-114718号公報等)、NASBA(Nucleic Acid Sequence Based Amplification)法 (特許第2650159号) 等を採用することができる。PCR法は、in vitroにおける核酸の増幅技術として現在最も一般的な方法である。

LAMP法は増幅対象となる塩基配列の末端にループ構造を形成し、そこを起点としてポリメラーゼによる伸長反応が起きると同時に、ループ内の領域にハイブリダイズしたプライマーが、鎖置換反応により核酸鎖を伸長しながら先の伸長反応の産物を1本鎖に解離させていくというものである。生成した1本鎖核酸はその末端に自己相補性領域を持つため、末端にループを形成し新たな伸長反応が始まる。実際のLA

MP法では等温で進行するため、上に述べた反応は同時に並行して起こる。LAMP法の特徴としては、等温で進行する鎖置換型の反応であることのほかに、増幅産物の量が非常に多いことが挙げられる。これは、ポリメラーゼが失活する原因である熱変性の操作が含まれていないことも一因である。増幅産物の量が多いということは、生成するピロリン酸の量、すなわち不溶性物質の量も多いので、本発明を適用する核酸増幅法としてLAMP法は好適である。

(1) LAMP法

まず、LAMP法の概要を示す（図1及び図2）。LAMP法において、まず増幅の対象となる鋳型ポリヌクレオチドを調製する。鋳型ポリヌクレオチド（DNA又はRNA）の調製は、化学合成により、あるいは組織又は細胞等の生物学的材料からの公知方法により行うことができる。この場合、増幅の標的領域の両側（標的領域の5'側及び3'側）には、適当な長さの配列（両側配列という）が存在するように鋳型ポリヌクレオチドを調製する（図1A）。両側配列とは、当該標的領域の5'末端からポリヌクレオチド鎖の5'末端までの領域の配列、及び当該標的領域の3'末端からポリヌクレオチド鎖の3'末端までの領域の配列を意味する（図1Aの両矢印（ \longleftrightarrow ）部分）。両側配列の長さは、標的領域の5'側及び3'側のいずれの領域も、10～1000塩基、好ましくは30～500塩基である。

標的領域及び両側配列を含む鋳型ポリヌクレオチド鎖（図1A）において、両側配列の中から任意に所定の領域を選択する。すなわち、標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって、順に第1の任意配列F1c、第2の任意配列F2c及び第3の任意配列F3cをそれぞれ選択する（図1B）。同様に、標的領域の5'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって、順に第4の任意配列R1、第5の任意配列R2及び第6の任意配列R3をそれぞれ選択する（図1B）。ここで、前記任意配列F1cと前記任意配列R1の選択に当たっては、F1cとR1との間の距離を0塩基、すなわち、隣接するように選択することや、F1cとR1とが一部重複するように選択することも可能である。上記第1～第6の領域は、それぞれ、調製されたポリヌクレオチド鎖の配列に応じて任意に選択される。選択する個々の領域は、それぞれ、5～100塩基が好ましく、10～50塩基がさらに好ましい。この塩基の長さを選択することにより、後述のプライマーがアニールしやすくなる。

また、各任意配列は、LAMP法により得られる増幅産物が分子間アニールではなく、図2 LのようにF1c配列とF1配列との間及びR1配列とR1c配列との間で分子内アニールを優先的に生じ、末端ループ構造を形成するように選択することが好ましい。例えば、分子内アニールを優先的に生じさせるためには、任意配列の選択に当たって、F1c配列とF2c配列との間の距離及びR1配列とR1c配列との間の距離を考慮することが重要である。具体的には、両者各配列が、0～500塩基、好ましくは0～100塩基、最も好ましくは10～70塩基の距離を介して存在するように選択することが好ましい。ここで、数値はそれぞれ、F1c配列及びF2c配列自身並びにR1配列及びR2配列自身を含まない塩基数を示している。

次に、FAプライマーと呼ばれるプライマーを設計及び合成しておいて、これをF2cにアニールさせる。「FAプライマー」とは、F2c領域に相補的な配列であるF2配列と、F1cと同一の配列（便宜上F1cともいう）とを含むものであって、例えば、F2の5'側に、F1c配列の3'末端が連結した構造を有するものが挙げられる（図1C）。また、

「アニール」とは、ヌクレオチド鎖が、ワトソン-クリックのモデルに基づく塩基対結合によって二本鎖構造を形成することをいう。FAプライマーを鋳型ポリヌクレオチド鎖上のF2c配列にアニールさせた後は、FAプライマー中のF2を起点として、DNA鎖合成を開始させる（図1D）。続いて、F3cに相補的な配列F3を含むプライマー

（以下、F3プライマーともいう）を鋳型ポリヌクレオチド鎖のF3c配列にアニールさせる（図1D）。そして、アニールさせたF3プライマーを起点として、鎖置換型DNA合成を行わせる（図1E）。「鎖置換型DNA合成」とは、プライマーを合成起点とする相補鎖合成反応の鋳型に他のポリヌクレオチドがすでにハイブリダイズして2本鎖構造となっているときに、そのポリヌクレオチドを鋳型から分離しながら相補鎖合成が進行する反応をいう。具体的には、FAプライマーによって合成された鎖を、F3プライマーによって合成された鎖が置換するように合成が進む反応が挙げられる。これは、換言すれば、FAプライマーによって合成された、鋳型ポリヌクレオチド鎖の相補鎖は、F3プライマーを起点として伸長した鎖によって剥離されるように置換することともいえる。

以上の合成反応によって、以下の(i)及び(ii)の2種類のヌクレオチド鎖を得ることができる。

(i) 鋳型ポリヌクレオチド鎖中の配列「(3')F3c-F2c-F1c-標的領域-R1-R2-R3(5')」に対して相補的な配列「(5')F3-F2-F1-標的領域-R1c-R2c-R3c(3')」を含むヌクレオチド鎖 (図1F)

(ii) 置換されて一本鎖となった (剥離された) ヌクレオチド鎖、すなわちその5'末端側にF1cと同一の配列を有する「(5')F1c-F2-F1-標的領域-R1c-R2c-R3c(3')」を含むヌクレオチド鎖 (図1G)

ここで、上記(ii)のヌクレオチド鎖において、F1とF1cとは互いに相補的であるため、F1とF1cとの間の鎖内水素結合によって両者はハイブリダイズし、ヘアピンループが形成される (図1G)。そして、ヘアピンループ中にF2が含まれる。

次に、上記(ii)のヌクレオチド鎖のR2c配列に、「RAプライマー」と呼ばれるプライマーをアニールさせる。RAプライマーは、R2配列の5'側に、R1配列に対して相補的な配列R1cの3'側が連結されている。そして、RAプライマーを合成起点としてDNA鎖合成を開始させる (図1H)。RAプライマーを合成起点として合成された伸長DNAがF1とF1cとの間で形成される相補鎖部分に達すると、図1Eに示す置換反応と同様にF1cの配列が当該伸長DNAによって置換される (図1I)。続いて鋳型ポリヌクレオチド鎖のR3cに、該配列に相補的な配列R3を含むプライマー (以下、R3プライマーともいう) をアニールさせる (図1J)。アニールさせたR3プライマーを起点として、鎖置換型のDNA合成を行わせる (図2J)。以上の合成反応によって、以下の(iii)及び(iv)の2種類のヌクレオチド鎖が合成される。

(iii) 配列「(5')F1c-F2-F1-標的領域-R1c-R2c-R3c(3')」に対して相補的なヌクレオチド鎖「(3')F1-F2c-F1c-標的領域-R1-R2-R3(5')」 (図2K)

(iv) 最も3'末端側にF1を、最も5'末端側にR1cを有するヌクレオチド鎖「(3')F1-F2c-F1-標的領域-R1-R2-R1c(3')」 (図2L)

なお、上記(iv)の配列は、3'側に存在する配列F1とF1cとの間及び5'側に存在する配列R1とR1cとの間の鎖内水素結合によってヘアピンループを形成する (図2L)。

次に、前記(iv)ヌクレオチド鎖のうち3'側のヘアピンループ部分のF2cにFAプライマーのF2領域をアニールさせる (図2M)。また、鎖内水素結合によりアニールしているF1を合成起点としてDNA鎖合成を開始させる。図1Mにおいて、F1を起点として合成される伸長鎖は、R1-R2-R1cで形成されるヘアピンループを開いて5'末端ま

で到達する。一方、F2を起点として反応が進むと、「F1c-標的領域-R1-R2-R1c」で構成される鎖に対する相補鎖が合成される。このとき、F1、及びF1を起点として合成された鎖「F1-標的領域-R1c-R2c-R1」は、上記F2を起点とする合成によって置換される。これによって、一本鎖突出構造「-標的配列-R1c-R2c-R1」を有する二本鎖DNAが得られる。かかる一本鎖突出構造部は、一本鎖突出構造部分（「R1c-R2c-R1」）のR1cとR1との間で鎖内水素結合を形成することによってヘアピンループを形成する（図2N）。この構造物は、鎖内水素結合によりアニールしているR1を合成起点としてDNA鎖合成を開始させる（図2N）。以上の合成反応によって、以下の(v)及び(vi)の2種類のヌクレオチド鎖を得る。

(v) 配列「(3')R1-R2-R1c-標的領域-F1-F2-F1c-標的領域-R1-R2c-R1c-標的領域-F1-F2c-F1c-標的領域-R1-R2-R1c(5')」（図2O）

(vi) 最も3'末端側にF1cを、最も5'末端側にR1を有する配列「(3')F1c-F2-F1-標的領域-R1c-R2c-R1(3')」（図2P）

上記(v)及び(vi)のヌクレオチド鎖は、いずれも鎖内水素結合によって、(v)についてはR2c、並びに(vi)についてはF2及びR2cをループ部分とするヘアピンループを形成する。上記(v)及び(vi)の2つの配列においてヘアピンループを形成しているR2c部分にはRAプライマーがアニールし、該プライマーを起点とするDNA合成が開始し、標的配列を含むヌクレオチド鎖（(vi)の配列に対する相補鎖）の合成が進む。この相補鎖は図2Lに示す配列と同一であるので、以下、図2L～Pの反応が繰り返される。一方、図1Aからの反応も進行し得るので、これらの一連の合成反応が繰り返されて、ポリヌクレオチド鎖の増幅が進行する。

上記の増幅反応においては、FAプライマー、RAプライマー、F3プライマー及びR3プライマーの4種類のプライマーを用いて増幅反応を行うものであるが、F3プライマー及びR3プライマーを使用せずに、FAプライマー及びRAプライマーの2種のプライマーのみを使用することによっても、等温下での増幅反応を起こさせることが可能である。なお、その場合には、反応系中にベタイン、トリメチルアミンN-オキシド（TMAO）、プロリン、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ホルムアミド等の融解温度(T_m)調整剤を共存させることが好ましい。

(2) 反応条件

LAMP法における反応は、緩衝液中にて、鑄型となる1本鎖の核酸に対して、以下の成分を加え、FA及びRAを構成する塩基配列が相補的な塩基配列に対して安定な塩基対結合を形成することができ、かつ酵素活性を維持しうる温度でインキュベートすることにより進行する。インキュベート温度は50～75℃、好ましくは55～70℃であり、インキュベート時間は1分～10時間、好ましくは5分～4時間である。

(i) 4種類のオリゴヌクレオチド (FA、RA、アウタープライマーF3及びアウタープライマーR3)

(ii) 鎖置換型の相補鎖合成を行うDNAポリメラーゼ

(iii) DNAポリメラーゼの基質となるヌクレオチド

なお、上記2つの態様のLAMP法において使用するFAプライマー及びRAプライマーをインナープライマー、F3プライマー及びR3プライマーをアウタープライマーともいう。

アウタープライマーからのヌクレオチド鎖合成は、インナープライマーからのヌクレオチド鎖合成よりも後に開始される必要がある。これを達成する方法として、インナープライマーの濃度をアウタープライマーの濃度よりも高く設定する方法などが挙げられる。具体的には、インナープライマーの濃度をアウタープライマーの濃度よりも、2～50倍、好ましくは4～25倍高く設定することにより実施することができる。

また、上記鎖置換型の相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼ（鎖置換型ポリメラーゼともいう）としては、Bst DNAポリメラーゼ、Bca(exo-)DNAポリメラーゼ、E. coli DNAポリメラーゼ I のクレノウフラグメント、Vent DNAポリメラーゼ、Vent(Exo-)DNAポリメラーゼ（Vent DNAポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの）、DeepVent DNAポリメラーゼ、DeepVent(Exo-)DNAポリメラーゼ（DeepVent DNAポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの）、Φ29ファージDNAポリメラーゼ、MS-2ファージDNAポリメラーゼ、Z-Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造）、KOD DNAポリメラーゼ（東洋紡績）などが挙げられる。

この反応は、酵素反応に好適なpHを与える緩衝剤、酵素の触媒活性の維持やアニールのために必要な塩類、酵素の保護剤、更には必要に応じて融解温度(T_m)の調整剤等の共存下で行う。緩衝剤としては、Tris-HCl等の中性から弱アルカリ性に緩衝

作用を持つものが用いられる。pHは使用するDNAポリメラーゼに応じて調整する。塩類としては $MgCl_2$ 、 KCl 、 $NaCl$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 等が挙げられ、酵素の活性維持と核酸の融解温度(T_m)調整のために適宜添加される。酵素の保護剤としては、ウシ血清アルブミンや糖類が利用される。更に融解温度(T_m)の調整剤には、ベタイン(N,N,N,-トリメチルグリシン)、トリメチルアミンN-オキシド (TMAO)、プロリン、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ホルムアミドが利用される。融解温度(T_m)の調整剤を利用することによって、前記オリゴヌクレオチドのアニールを限られた温度条件の下で調整することができる。特に、ベタイン及びトリメチルアミンN-オキシド (TMAO) は、そのisostabilize作用によって鎖置換効率の向上にも有効である。ベタインは、反応液中0.2~3.0 M、好ましくは0.5~1.5 M程度の添加により、本発明の核酸増幅反応の促進作用を期待できる。これらの融解温度の調整剤は、融解温度を下げる方向に作用するので、塩濃度や反応温度等のその他の反応条件を考慮して、適切なストリンジェンシーと反応性を与える条件を経験的に設定する。

4. 検出

本発明の核酸増幅の有無の検出方法においては、反応生成物の不溶性物質を検出の指標とする。さらには、増幅反応に伴い生成する不溶性物質を経時的に検出することにより核酸増幅反応をモニタリングすることが可能である。検出対象である不溶性物質は、増幅反応に用いられたヌクレオチドから生成したピロリン酸と、反応液中の金属イオンとが結合したピロリン酸塩、例えばピロリン酸マグネシウムである。

(1) 目視による検出

増幅反応に伴い生成した不溶性物質の最も簡便な検出法は、増幅反応後の反応液の濁りの有無を目視により確認する方法である。次いで簡便な検出法は、増幅反応後の反応液を遠心処理し、沈殿した不溶性物質の有無を目視により確認する方法である。

(2) 濁度の検出

反応生成物の吸光度又は散乱光強度を測定して反応液の濁度を求めることにより、その濁度を指標として核酸増幅の有無を検出をすることもできる。吸光度の測定に

は通常用いられている測定装置を用いることができる。吸光度測定のための波長は適宜設定することができ、300～800nm、好ましくは主波長340～400nm、副波長600～800nmで測定する。散乱光強度の測定には通常用いられている測定装置を用いることができる。

本発明においては、特に吸光度の経時変化を測定することにより、反応時間により核酸増幅反応がどのように推移したか、そのモニタリングをすることができる。

(3) フィルターを用いた検出

反応生成物を有色のフィルターでろ過し、フィルター上の残渣を目視や光の反射率の変化により検出することもできる。

また、ポリアクリル酸、カルボキシメチルデキストラン等の凝集剤を添加することにより、沈殿量を増加させ検出感度を向上させることが可能である。さらに、これらの不溶性物質を着色又は標識することにより、検出を容易にしたり検出感度を向上させることができる。例えば、アシッドオレンジを添加することにより不溶性物質に着色できるので検出が容易になる。

5. 核酸増幅の有無の検出用又は核酸増幅反応のモニタリング用キット

上記4の核酸増幅の有無の検出方法又は核酸増幅反応のモニタリング方法は、実施に必要な試薬類を、パッケージングし、キットとして供給することが可能である。より具体的には、以下の構成要素を含むものが挙げられる。

〔キットの構成要素〕

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c、第2の任意配列F2c及び第3の任意配列F3cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端からポリ該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第4の任意配列R1、第5の任意配列R2及び第6の任意配列R3をそれぞれ選択した場合、前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、前記F3cに対し相補的な配列F3を含むプライマー、前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマー並びに前記R3と同一の配列を含むプライマー、

(b) 鎖置換型の相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼ、

(c) 要素(b)の基質となるヌクレオチド、並びに

(d) 凝集剤（例えば、ポリアクリル酸、カルボキシメチルデキストラン）

上記キットの構成要素は、使用するLAMP法の態様に応じて変化し得る。すなわち、必要に応じて、上記構成要素(a)から、任意配列F3cに対し相補的な配列F3を含むプライマー及び任意配列R3と同一の配列を含むプライマーを省略することが可能である。また、構成要素として、融解温度調整剤（例えば、ベタイン、トリメチルアミンN-オキシド、プロリン、ジメチルスルホキシド、ホルムアミド）を加えることが好ましい。さらに、必要に応じて、酵素反応に好適な条件を与える緩衝液、合成反応生成物の検出のために必要な試薬類が加えられ得る。さらに、本発明の好ましい態様においては、1回の反応に必要な試薬を反応容器に分注した状態で供給することも可能である。

図面の簡単な説明

図1は、LAMP法による増幅方法の概要を示す図である。

図2は、LAMP法による増幅方法の概要を示す図である。

図3は、LAMP法により増幅した結果得られた生成物の白色沈殿を示す写真である。

図4は、LAMP反応液の吸収スペクトルを示す図である。

図5は、白色沈殿物、市販の $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ の赤外線吸収スペクトルを示す図である。

図6は、波長400nmにおける濁度とピロリン酸イオン濃度との関係を示す図である。

図7は、LAMP反応液の波長500nmにおける濁度の経時変化を示す図である。

図8は、LAMP反応液の波長400nmにおける濁度の経時変化を示す図である。

図9は、濁度と合成されたDNA量との関係を示す図である。

図10は、閾時間と鋳型DNA量との関係を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例 1〕

(1) LAMPの反応

反応液組成 (100 μ L 中)

20 mM Tris-HCl pH 8.8
 10 mM KCl
 10 mM (NH₄)₂SO₄
 4 mM MgSO₄
 1 M ベタイン
 0.4 mM dNTP
 8 U Bst DNA ポリメラーゼ

増幅の目的ポリヌクレオチドは、熱変性をしない 1×10^4 分子の λ DNA (配列番号 1) を用いた。

5'-GCTTATCTTTCCCTTTATTTTTGCTGCGGTAAGTCGCATAAAAACCATTCTTCATAATTCAATCCATTTAC
 TATGTTATGTTCTGAGGGGAGTGAAAATTCCTTAATTCGATGAAGATTCTTGCTCAATTGTTATCAGCTATGC
 GCCGACCAGAACACCTTGCCGATCAGC-3' (配列番号 1)

配列番号1において標的領域、F1c、F2c、F3c、R1、R2、R3に対応する領域は以下の通りである。

標的領域：配列番号 1 に示す塩基配列の第92番目のGのみ

F1c：配列番号 1 に示す塩基配列の第68～91番目(24bp)

F2c：配列番号 1 に示す塩基配列の第25～50番目(26bp)

F3c：配列番号 1 に示す塩基配列の第1～24番目(24bp)

R1：配列番号 1 に示す塩基配列の第93～115番目(23bp)

R2：配列番号 1 に示す塩基配列の第129～152番目(24bp)

R3：配列番号 1 に示す塩基配列の第153～172番目(20bp)

以下の配列を有するプライマーを反応液中に入れ65℃で1時間反応させた。

プライマー：

1600 nM インナープライマー-FA

5'-TCCCCTCAGAACATAACATAGTAATGCGGTAAGTCGCATAAAAACCATTTC-3' (配列番号 2)

1600 nM インナープライマー-RA

5'-TGAAAATTCCTTAATTCGATGAGGTGCGCGCATAGCTGATAACAAT-3' (配列番号 3)

400 nM アウタープライマーF3

5'-GCTTATCTTTCCCTTTATTTTGC-3' (配列番号4)

400 nM アウタープライマーR3

5'-GCTGATCGGCAAGGTGTTCT-3' (配列番号5)

(2) LAMPの白色沈殿

LAMP反応終了後、10,000 rpmで5分間遠心した。遠心後、白色の沈殿物がチューブ (0.2 μ lチューブ) の底に生じることを確認することができた (図3右)。なお、図3左のチューブはネガティブコントロール (鑄型なし) である。

(3) LAMP反応物の吸光度測定

測定機器: Pharmacia Biotech Ltd., Ultrospec 2000

光路長: 1cm

セル容量: 100 μ l

LAMP反応終了後、A500 nmのときの吸光度を測定した。反応が進んだサンプルでは吸光度の値が1.21を示したのに対して、反応が進まなかったサンプル (ネガティブコントロール) では0.25であった。

また、吸収スペクトルを、1cmセルを用いて室温で測定した結果、LAMP反応液はA300 nmからA600 nmにわたってブロードな吸収スペクトルを示した (図4)。

dNTPsやDNAはこのような長波長領域に吸収を持たないことから、このブロードな吸収は、反応液内に生じた微粒子成分による入射光の散乱に基づくものであると思われる。これを確認するために、反応液を光散乱粒子計で分析した。その結果、平均直径約2 μ mの微粒子が生成していることが確認された。

以上より、LAMP反応による核酸増幅の有無を吸光度 (濁度) を指標として確認できることが判明した。

〔実施例2〕 沈殿物の解析

LAMP法により得られた白色沈殿がピロリン酸マグネシウムであると仮定し、まず最初にピロリン酸塩であるかを検討した。実施例1で得られた沈殿物に100 μ lの1N NaOHを加え、65°C、5分間温めた。遠心後、上清を別のチューブに移し、溶液を中性にするために100 μ lの1N HClを加えた。この溶液に0.1 N AgNO₃を加えたと同

時に白濁した($\text{Ag}_4\text{P}_2\text{O}_7$ の生成)。白色に呈したことから、ピロリン酸塩であることが判明した。

次に、金属がマグネシウムであるかを確かめるために、チタンイエロー試薬を用いて検討した。チタンイエロー試薬はマグネシウム又はホウ素を検出するための試薬であるが、現在の反応系にはホウ素は含まれておらず、検出できるのはマグネシウムだけである。

沈殿物に20 μl の0.1N HClを加え溶解後、1 μl の2 mg/ml チタンイエロー試薬を加えた。溶液をアルカリ性にするために20 μl の1N NaOHを加えた。この結果、チタンイエロー試薬により赤褐色を呈した沈殿物が確認できた。このことより、白色沈殿物中にマグネシウムが存在していることが判明した。

また、沈殿物をIRスペクトル分析に供試した。すなわち、まず実施例1において得られた沈殿物を遠心分離により凝集させた。凝集物を水で3回洗浄後、シリカゲルデシケーター中で1週間乾燥した。得られた乾燥物について、KBr法を用い、室温下、64回の積算によりIRスペクトルを測定した。なお、対照として、市販(Merk社製)のピロリン酸マグネシウム($\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$)及びモノリン酸マグネシウム($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$)を使用した。その結果、図5に示したように、沈殿物のIRスペクトルは市販の $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ と一致した。また、有機化合物に特徴的なCH伸縮ピーク(通常、2900 cm^{-1} ; 図5中の破線矢印付近)が見られないことから、沈殿物中には有機物は殆ど含まれていないことがわかった。

以上の結果から、白色沈殿はピロリン酸マグネシウムであることが判明した。

〔実施例3〕 マグネシウムイオンとピロリン酸イオンによる沈殿物生成反応

以下の反応液に任意の濃度となるように $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ を加え、65°Cで1時間反応させたときの生成した沈殿物を、反応液の吸光度(A 440nm)を測定することにより調べた。

(以下余白)

 反応液組成

20 mM Tris-HCl pH 8.8

10 mM KCl

10 mM (NH₄)₂SO₄4 mM MgSO₄

結果を図6に示した。図6に示すように、P₂O₇イオン濃度が0.5 mMを越えたときに沈殿物が生成することがわかった。P₂O₇イオンが0.5 mM以上生成するためには、DNAが4 μg/25 μl以上合成される必要がある。LAMPは、通常DNAを20 μg/25 μl以上合成可能である。一方、PCRで合成されるDNA量はLAMPの1/100程度なので、通常のPCRではピロリン酸マグネシウムの沈殿は生成されない。今後、LAMPのように多量のDNAを合成可能な増幅法が発明された場合にも、この方法は増幅の有無の検出に有用である。

[実施例4] LAMP反応の吸光度による経時的変化（モニタリング）

LAMP反応を石英セル（1cmセル）中で65℃、1.5時間行った。反応組成液、プライマー等の試料は、実施例1と同様である。この間、経時的にA500 nmの吸光度を測定した。その結果、ネガティブコントロールでは吸光度に変化が見られなかったが、ポジティブコントロールでは60分をピークとする吸光度の上昇が観察された（図7）。図7において、「○」は反応液を、「●」はネガティブコントロール（鋳型なし）を示す。

同様に、1×10⁻²⁰molのPSA（前立腺特異抗原）DNA（配列番号6）を鋳型として用い、LAMP反応を石英セル中で、65℃、40分間行い、経時的にA400 nmの吸光度を測定した。

5'-TGCTTGTGGCCTCTCGTGGCAGGGCAGTCTGCGGCGGTGTTCTGGTGCACCCCCAGTGGGTCCTCACAGCTGCCACTGCATCAGGAACAAAAGCGTGATCTTGCTGGGTCGGCACAGCCTGTTTCATCCTGAAGACACAGGCCAGGTATTTGAGGTCAGCCACAGCTTCACACACCC-3'（配列番号6）

配列番号6において標的領域、F1c、F2c、F3c、R1、R2、R3に対応する領域は以下の通りである。

標的領域：配列番号6に示す塩基配列の第91～102番目（12bp）

F1c：配列番号6に示す塩基配列の第68～90番目（23bp）

F2c : 配列番号 6 に示す塩基配列の第26～44番目(19bp)

F3c : 配列番号 6 に示す塩基配列の第 1 ～18番目(18bp)

R1 : 配列番号 6 に示す塩基配列の第103～122番目(22bp)

R2 : 配列番号 6 に示す塩基配列の第139～161番目(23bp)

R3 : 配列番号 6 に示す塩基配列の第162～178番目(17bp)

以下の配列を有するプライマーを反応液中に入れ65℃で1時間反応させた。

プライマー :

1600 nM インナープライマーFA

5'-TGTTCTGATGCAGTGGGCAGCTTTAGTCTGCGGCGGTGTTCTG-3' (配列番号 7)

1600 nM インナープライマーRA

5'-TGCTGGGTCGGCACAGCCTGAAGCTGACCTGAAATACCTGGCCTG-3' (配列番号 8)

400 nM アウタープライマーF3

5'-TGCTTGTGGCCTCTCGTG-3' (配列番号 9)

400 nM アウタープライマーR3

5'-GGGTGTGTGAAGCTGTG-3' (配列番号 10)

その結果、ネガティブコントロールでは、吸光度に変化が見られなかったが、ポジティブコントロールでは約30分でプラトーに達した(図8)。

以上の結果から、ピロリン酸マグネシウムの白色沈殿を経時的に観察することにより、LAMP反応による核酸増幅反応を経時的にモニタリングできることが判明した。

[実施例 5] 濁度とDNA合成量との関係

実施例 4 と同様に、PSA DNAを鋳型としたLAMP反応を行い、経時的に濁度の測定(A400 nm)とDNAの定量を行った。なお、DNAの定量は、PicoGreen dsDNA定量キット(Molecular Probe社製)により行った。濁度のDNA量との関係を図9に示した。図9から明らかなように、濁度とDNA量との間には直線関係が見られ、濁度はDNA合成量に比例して増加することが示された。

[実施例 6] LAMP反応による鋳型DNAの定量

10⁴、10⁶、10⁸分子のPSA DNAを鋳型として用い、濁度(A400 nm)をリアルタイム

で測定し、濁度が1.0に達するまでの時間（閾時間）を計測した。DNA量と閾時間との関係を図10に示した。図10から明らかなようにDNA量と閾時間との間には直線関係が認められた。よって、濁度をリアルタイムで測定し、閾時間を求めることによって、鋳型DNAの量を定量できることが判明した。

〔実施例7〕 凝集剤を用いた沈殿

LAMP反応溶液に、凝集剤として400 μ Mのポリアクリル酸（MW100,000）又は10mMのカルボキシメチルデキストラン（MW10,000）を添加し、LAMP反応を行った。その結果、凝集剤を添加することによって沈殿物の量が増大した。

〔実施例8〕 不溶性物質の着色

ピロリン酸マグネシウムの白色沈殿を着色することにより、検出を容易にすることができると検討した。0.1 gのピロリン酸マグネシウムに対し、750 μ lのアシッドオレンジ（終濃度65 μ M）を添加した。対照としてアシッドオレンジのみの溶液を用意した。室温で4時間攪拌後、上清のアシッドオレンジの吸光度を測定し、対照溶液との吸光度の差からピロリン酸マグネシウムへの着色量を計算した。

その結果、0.1 gのピロリン酸マグネシウムに対し、52.8 nmolのアシッドオレンジが着色された。これは、この反応系に添加したアシッドオレンジの約半分量がピロリン酸マグネシウムの白色沈殿に吸着したことになる。以上の結果から、ピロリン酸マグネシウムの白色沈殿に色素を吸着させることにより、検出を容易にすることが可能であることが示唆された。また、上記のように上清の色の変化を指標とする検出も可能であることが示された。

配列表フリーテキスト

配列番号1：合成DNA

配列番号2：合成DNA

配列番号3：合成DNA

配列番号4：合成DNA

配列番号5：合成DNA

配列番号 6 : 合成DNA

配列番号 7 : 合成DNA

配列番号 8 : 合成DNA

配列番号 9 : 合成DNA

配列番号 10 : 合成DNA

産業上の利用可能性

本発明により、核酸増幅の有無を検出するための新しい方法が提供される。本発明の方法によれば、増幅反応に伴って生成する不溶性物質を濁度や沈殿の有無により検出することができるので、きわめて簡便に増幅の有無を検出できる。

請 求 の 範 囲

1. 酵素を用いた核酸の合成反応において、生成する不溶性物質を指標として核酸合成の有無を検出する方法。

2. ポリヌクレオチド鎖上の標的領域を増幅し、増幅反応に伴い生成する不溶性物質を指標として核酸増幅の有無を検出する方法。

3. 増幅が、以下の工程：

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c、第2の任意配列F2c及び第3の任意配列F3cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第4の任意配列R1、第5の任意配列R2及び第6の任意配列R3をそれぞれ選択し、

(b) 前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、前記F3cに対し相補的な配列F3を含むプライマー、前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマー、並びに前記R3と同一の配列を含むプライマーをそれぞれ調製し、

(c) 前記ヌクレオチド鎖を鋳型として、鎖置換型ポリメラーゼ、前記プライマー、基質及び緩衝液の存在下でDNA合成反応を行うこと、
により行われるものである請求項2記載の方法。

4. 増幅が、以下の工程：

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c及び第2の任意配列F2cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第3の任意配列R1及び第4の任意配列R2をそれぞれ選択し、

(b) 前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、並びに前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマーをそれぞれ調製し、

(c) 前記ヌクレオチド鎖を増幅用鋳型として、鎖置換型ポリメラーゼ、前記プライマー、基質及び緩衝液の存在下でDNA合成反応を行うこと、

により行われるものである請求項2記載の方法。

5. 融解温度調整剤の存在下でDNA合成反応を行う請求項3又は4記載の方法。

6. 融解温度調整剤が、ベタイン、トリメチルアミンN-オキシド、プロリン、ジメチルスルホキシド及びホルムアミドのいずれかである請求項5記載の方法。

7. 不溶性物質を指標とする検出が、濁度の測定又は沈殿の検出によるものである請求項1～6のいずれかに記載の方法。

8. 濁度の測定又は沈殿の検出が、さらに凝集剤を加えて行うものである請求項7記載の方法。

9. 凝集剤が、ポリアクリル酸又はカルボキシメチルデキストランである請求項8記載の方法。

10. ポリヌクレオチド鎖上の標的領域を増幅し、増幅反応に伴い生成する不溶性物質を経時的に検出することを特徴とする核酸増幅反応のモニタリング方法。

11. 増幅が、以下の工程：

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c、第2の任意配列F2c及び第3の任意配列F3cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第4の任意配列R1、第5の任意配列R2及び第6の任意配列R3をそれぞれ選択し、

(b) 前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、前記F3cに対し相補的な配列F3を含むプライマー、前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマー、並びに前記R3と同一の配列を含むプライマーをそれぞれ調製し、

(c) 前記ヌクレオチド鎖を鋳型として、鎖置換型ポリメラーゼ、前記プライマー、基質及び緩衝液の存在下でDNA合成反応を行うこと、
により行われるものである請求項10記載の方法。

12. 増幅が、以下の工程：

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c及び第2の任意配列F2cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第3の任意

配列R1及び第4の任意配列R2をそれぞれ選択し、

(b) 前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、並びに前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマーをそれぞれ調製し、

(c) 前記ヌクレオチド鎖を増幅用鋳型として、鎖置換型ポリメラーゼ、前記プライマー、基質及び緩衝液の存在下でDNA合成反応を行うこと、
により行われるものである請求項10記載の方法。

13. 融解温度調整剤の存在下でDNA合成反応を行う請求項11又は12記載の方法。

14. 融解温度調整剤が、ベタイン、トリメチルアミンN-オキシド、プロリン、ジメチルスルホキシド及びホルムアミドのいずれかである請求項13記載の方法。

15. 不溶性物質を指標とする検出が、濁度の測定によるものである請求項10～14のいずれかに記載の方法。

16. 濁度の測定が、さらに凝集剤を加えて行うものである請求項15記載の方法。

17. 凝集剤が、ポリアクリル酸又はカルボキシメチルデキストランである請求項16記載の方法。

18. 以下の要素を含む核酸増幅の有無の検出用又は核酸増幅反応のモニタリング用キット。

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c、第2の任意配列F2c及び第3の任意配列F3cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第4の任意配列R1、第5の任意配列R2及び第6の任意配列R3をそれぞれ選択した場合、前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、前記F3cに対し相補的な配列F3を含むプライマー、前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマー、並びに前記R3と同一の配列を含むプライマー、

(b) 鎖置換型の相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼ、

(c) 要素(b)の基質となるヌクレオチド、

(d) 融解温度調整剤、並びに

(e) 凝集剤

19. 以下の要素を含む核酸増幅の有無の検出用又は核酸増幅反応のモニタリング用キット。

(a) ポリヌクレオチド鎖上の標的領域の3'末端から当該ポリヌクレオチド鎖の3'末端方向に向かって順に第1の任意配列F1c及び第2の任意配列F2cをそれぞれ選択し、標的領域の5'末端から当該ヌクレオチド鎖の5'末端方向に向かって順に第3の任意配列R1及び第4の任意配列R2をそれぞれ選択した場合、前記F2cに対し相補的な配列F2及び該F2の5'側に前記F1cと同一の配列を含むプライマー、並びに前記R2と同一の配列及び該配列の5'側に前記R1に対し相補的な配列R1cを含むプライマー、

(b) 鎖置換型の相補鎖合成反応を触媒するポリメラーゼ、

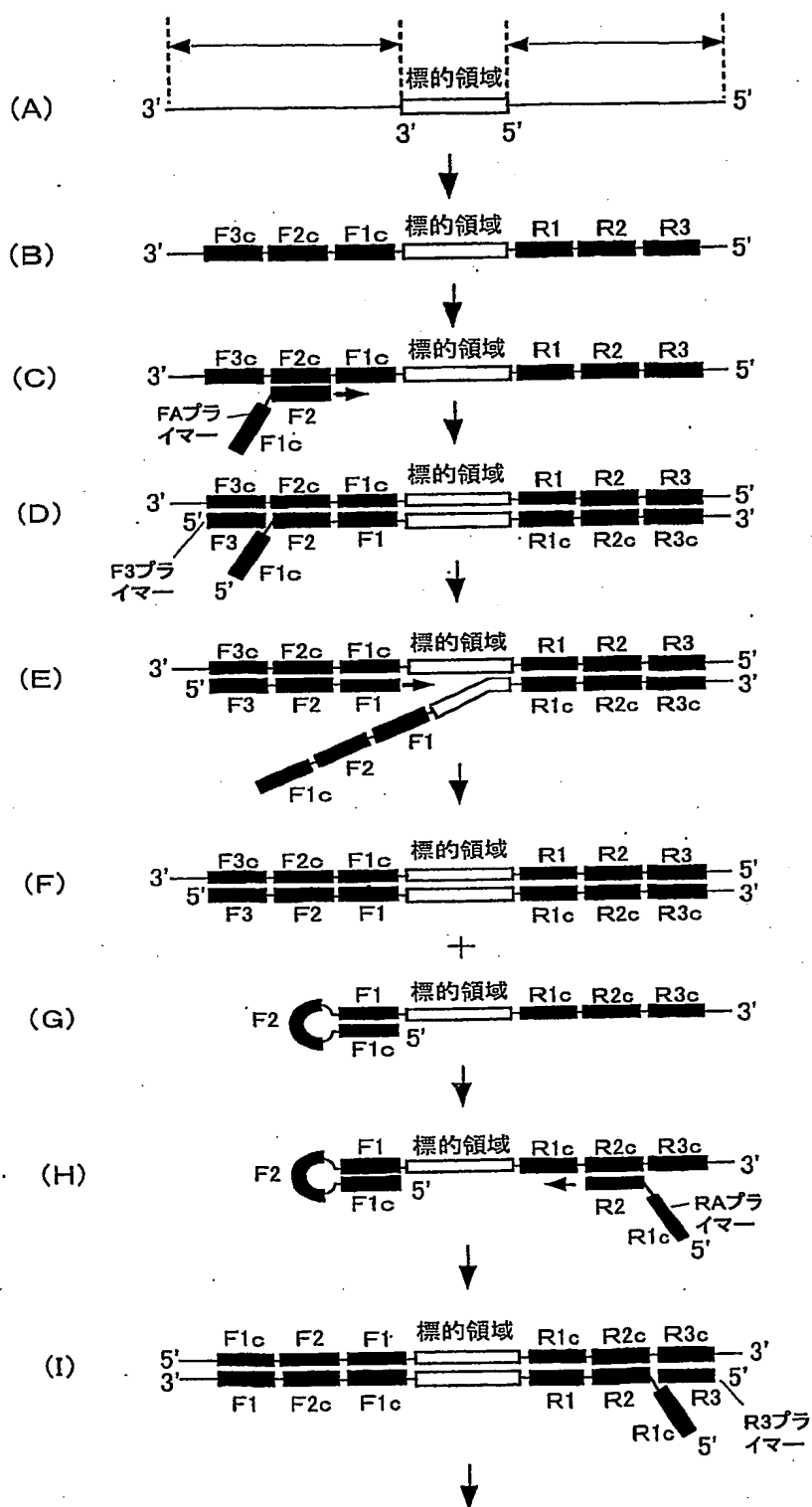
(c) 要素(b)の基質となるヌクレオチド、

(d) 融解温度調整剤、並びに

(e) 凝集剤

20. 融解温度調整剤が、ベタイン、トリメチルアミンN-オキシド、プロリン、ジメチルスルホキシド及びホルムアミドのいずれかであり、凝集剤が、ポリアクリル酸又はカルボキシメチルデキストランである請求項18又は19記載のキット。

図 1




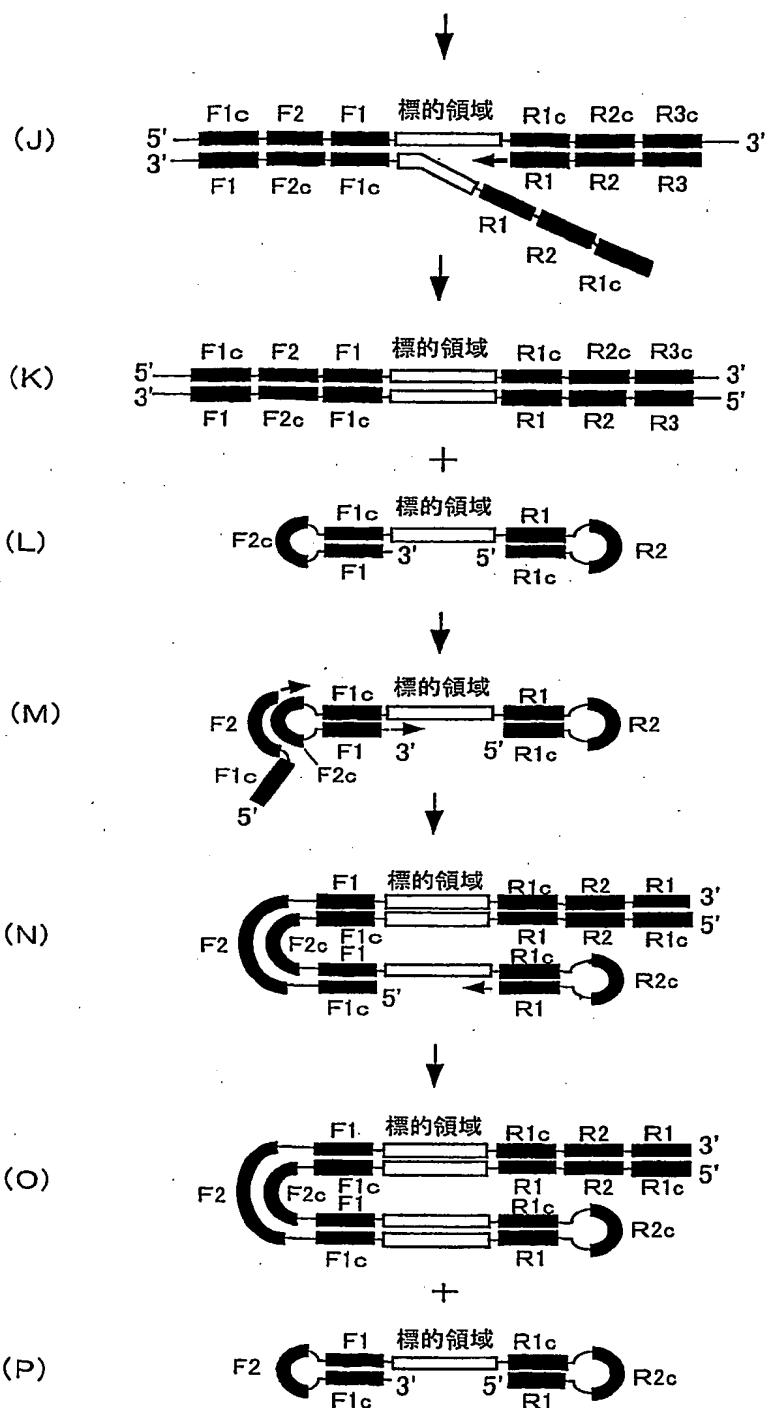
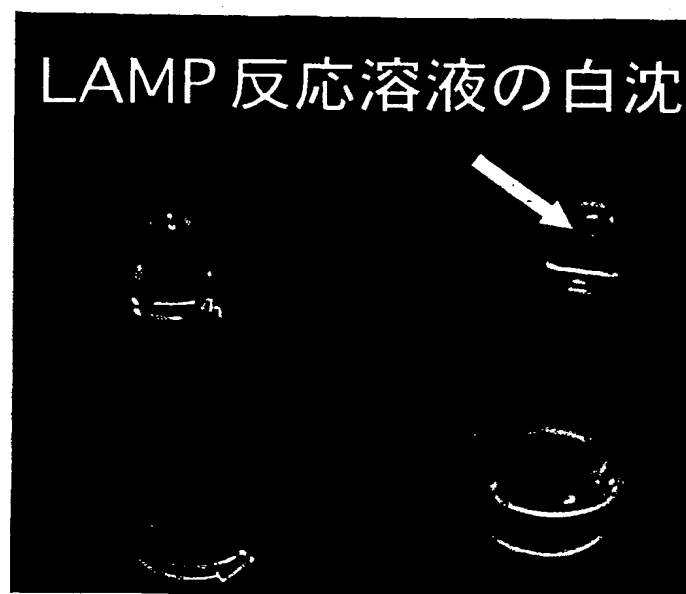



図 3



ネガティブ ポジティブ

図 4

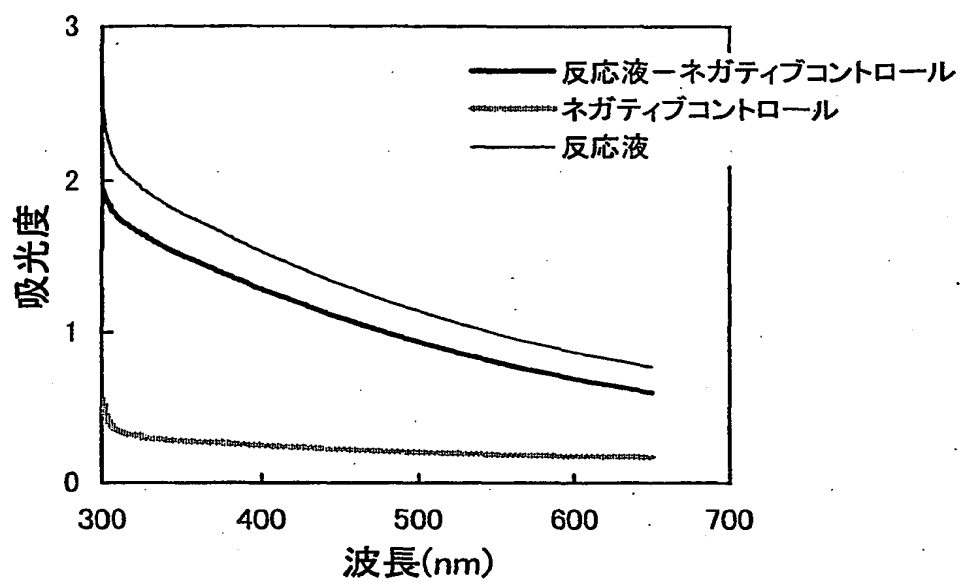


図 5

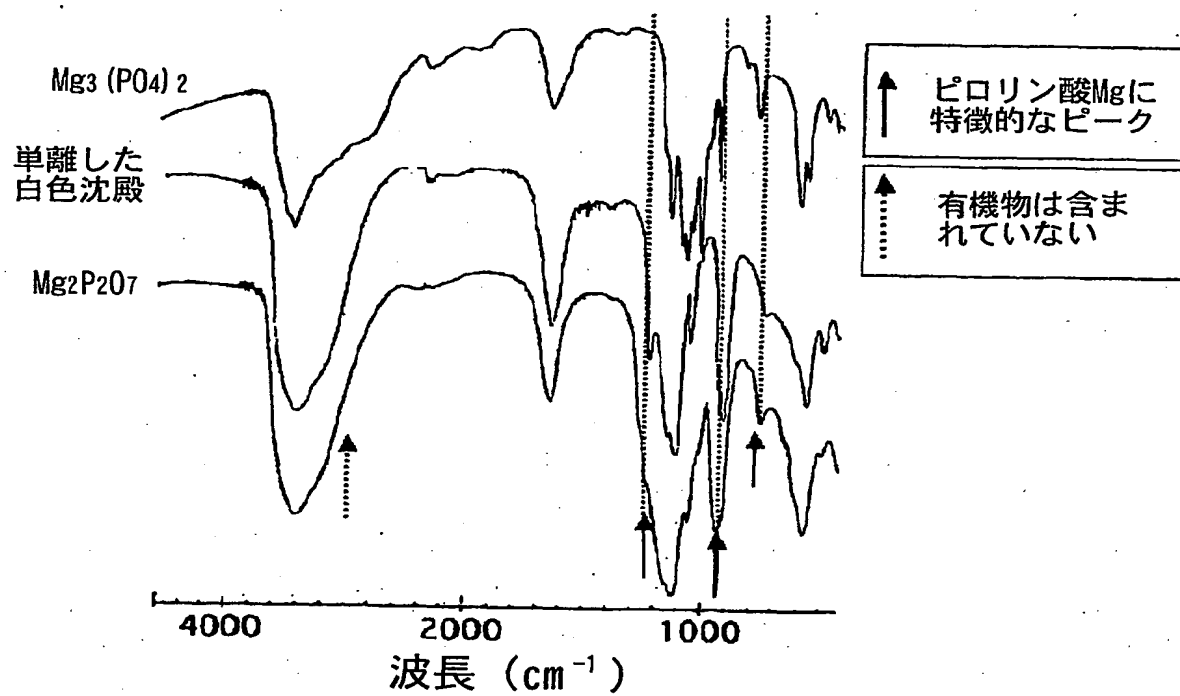


図 6

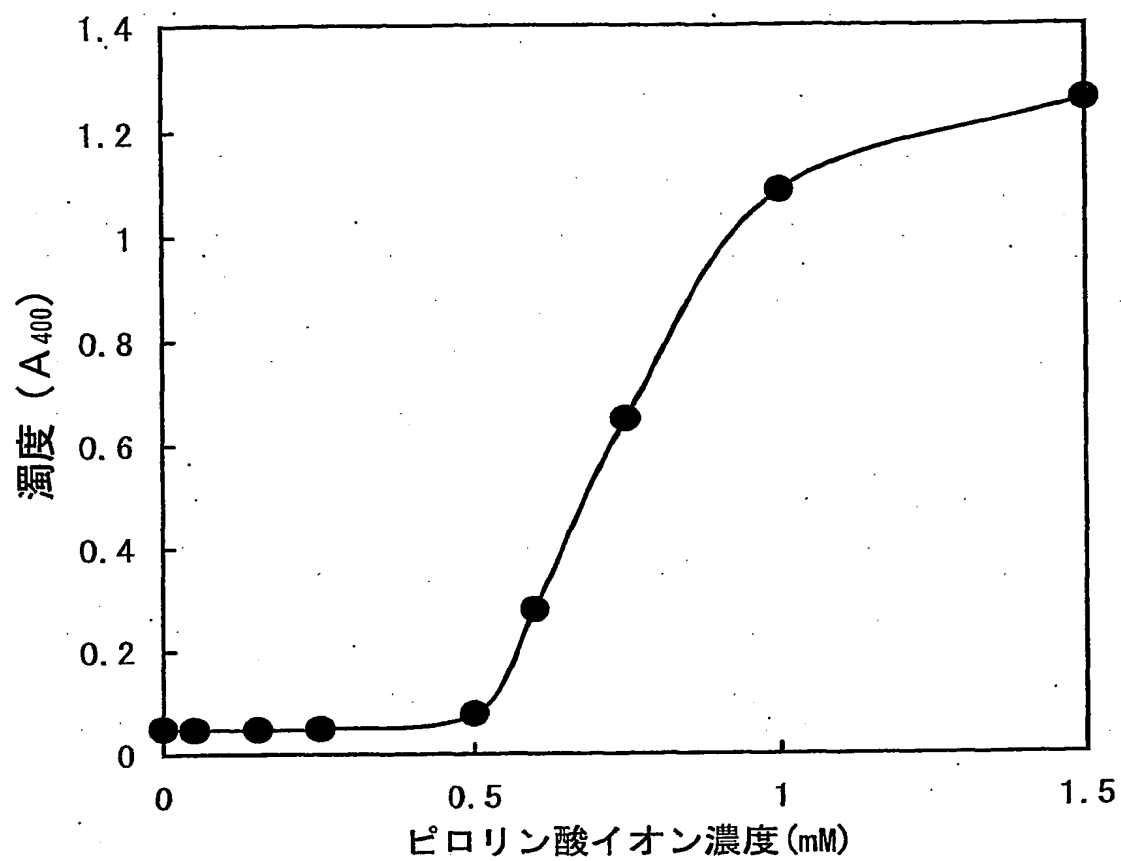


図 7

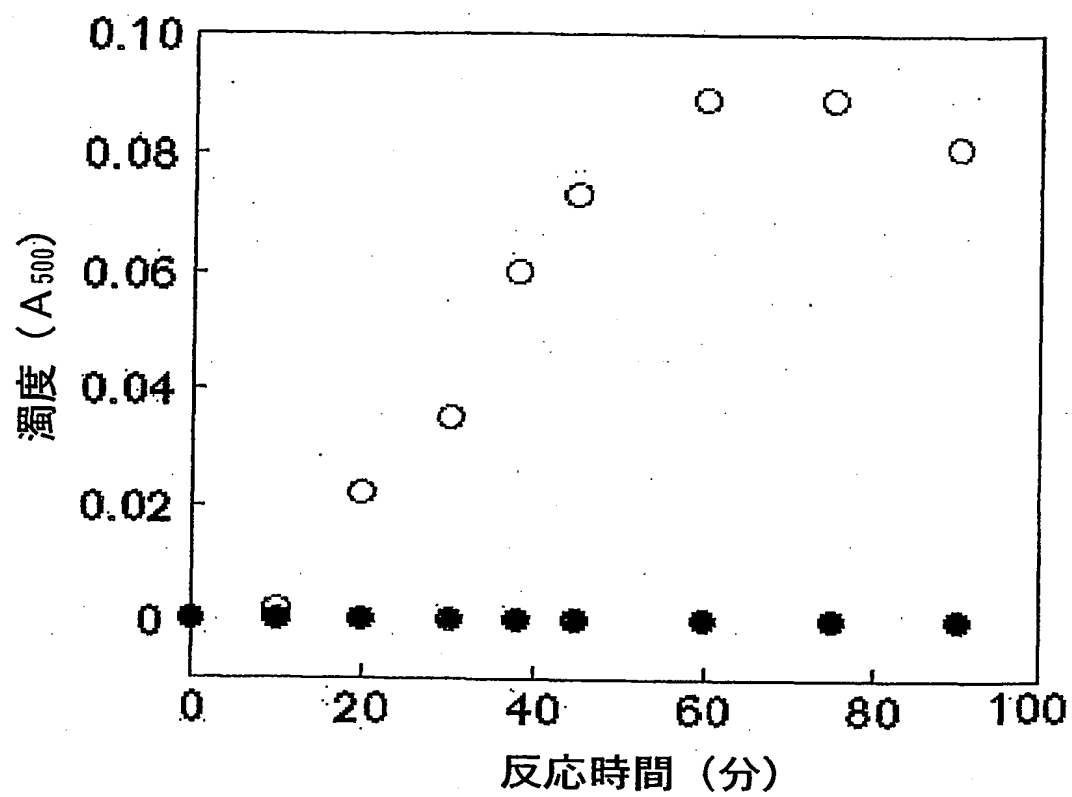


図 8

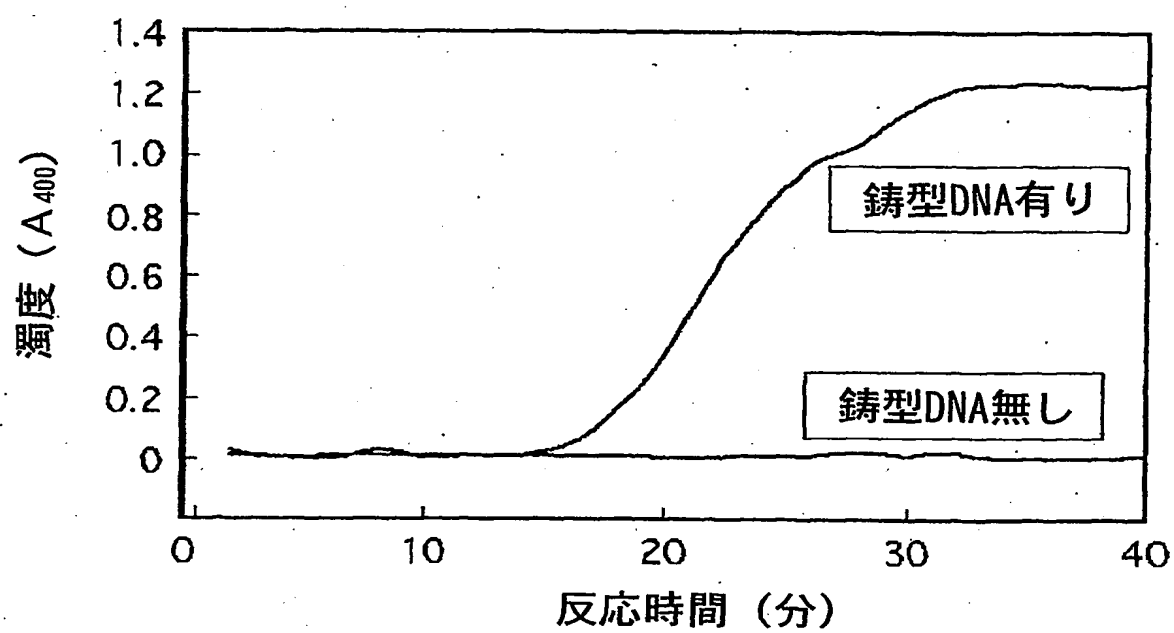


図 9

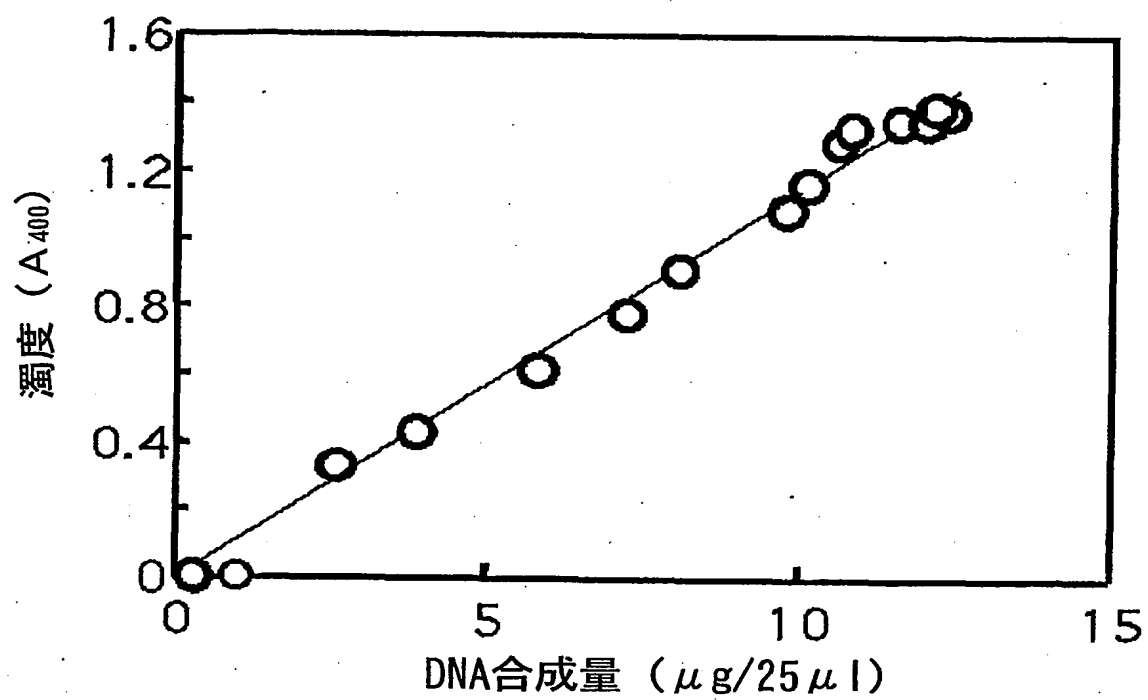
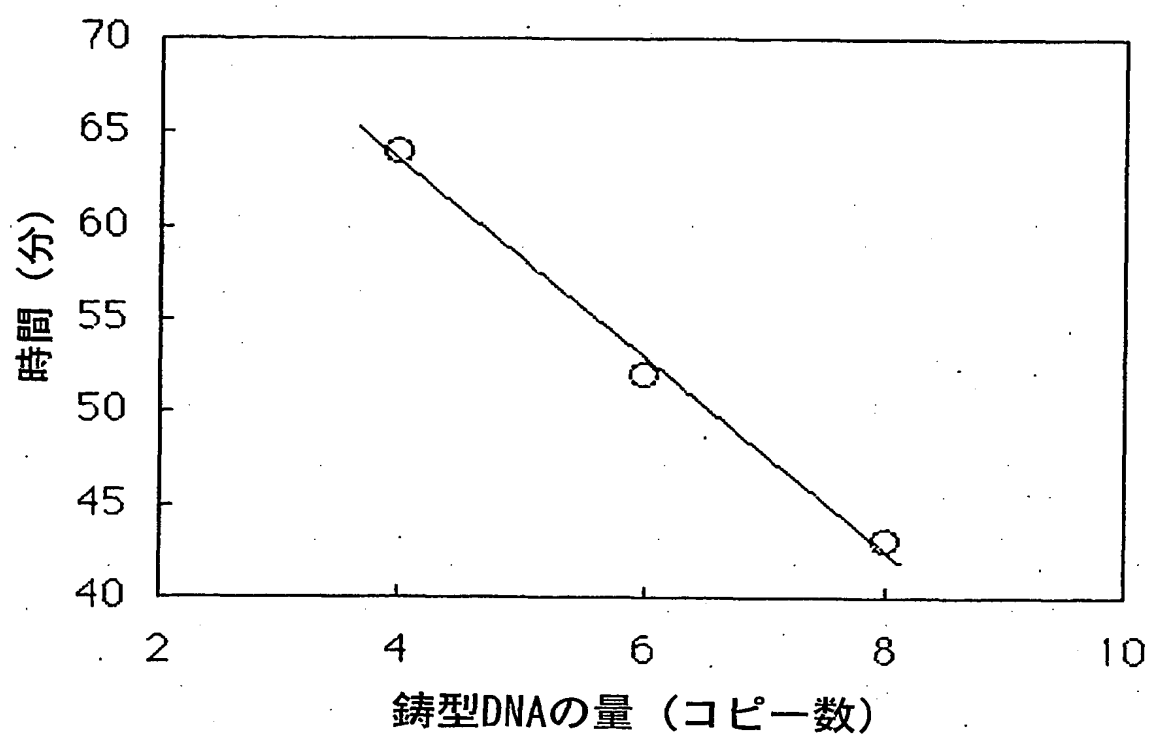


図 10



SEQUENCE LISTING

<110> EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

<120> METHOD OF DETECTING AMPLIFIED PRODUCTS OF GENE

<130> PH-1166-PCT

<150> JP 2000-132667

<151> 2000-05-01

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 172

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 1

```
gcttatcttt ccctttatctt ttgctgctgt aagtcgcata aaaaccattc ttcataattc 60
aatccattta ctatgttatg ttctgagggg agtgaaaatt cccctaattc gatgaagatt 120
cttgctcaat tgttatcagc tatgcgccga ccagaacacc ttgccgatca gc 172
```

<210> 2

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 2

tccccctcaga acataacata gtaatgcggt aagtcgcata aaaaccattc 50

<210> 3

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 3

tgaaaattcc cctaattcga tgaggtcggc gcatagctga taacaat 47

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 4

gcttatcttt ccctttatctt ttgc 24

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 5

gctgatcggc aaggtgttct

20

<210> 6

<211> 178

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 6

tgcttgtggc ctctcgtggc agggcagtct gcggcgggtgt tctggtgcac cccagtgagg 60 tcctcacagg
tgcccactgc atcaggaaca aaagcgtgat cttgctgggt cggcacagcc 120 tgtttcatcc
tgaagacaca ggccaggtat ttcaggtcag ccacagcttc acacaccc 178

<210> 7

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 7

tgttcctgat gcagtgggca gctttagtct gcggcgggtgt tctg

44

<210> 8

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 8

tgctgggtcg gcacagcctg aagctgacct gaaataacctg gcctg

45

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 9

tgcttgtggc ctctcgtg

18

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 10

gggtgtgtga agctgtg

17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03572

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	EP 297379 A2 (Molecular Diagnostics Inc.), 04 January, 1989 (04.01.89), & JP 1-98499 A	1, 7-8 2-6, 9-20
X A	EP 663447 A2 (Eiken Chemical Co., Ltd.), 19 July, 1995 (19.07.95), & JP 7-231799 A & US 5849487 A	2, 7-8, 10, 15-16 3, 6, 9, 11-14, 17-20
X A	EP 726312 A2 (Johnson & Johnson Clinical Diagnostics), 14 August, 1996 (14.08.96), & JP 8-173159 A & US 5622822 A	1, 7-8 2-6, 9-20
X A	EP 707077 A2 (Johnson & Johnson Clinical Diagnostics), 17 April, 1996 (17.04.96), & JP 8-173194 A & US 5582988 A	1, 7-8 2-6, 9-20
P, X	Yasuyoshi MORI et al., "Pyrolithic-san Magnesium no Chinden Seisei wo Shihyou to shita LAMP-hou no Kan-i Kenshutsu", Dai 23kai Nippon Bunshi Seibutsu Gakkai Nenkai Program, Kouen Youshishuu, November, 2000, page 379, 1PB-186	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
03 August, 2001 (03.08.01)

Date of mailing of the international search report
14 August, 2001 (14.08.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03572

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y P, A	Tsugunori Notomi et al., "Loop-mediated isothermal amplification of DNA," Nucleic Acids Research, June, 2000, Vol.28, No.12, p. e63	1-8, 10-16, 18-20 9, 17
P, A	Kentaro NAGAMINE et al., " Shinki Kakusan Zoufukuhou (LAMP: Loop-mediated isothermal amplification) no Kaihatsu, Dai 23 Nippon Bunshi Seibtsu Gakkai Nenkai Program, Kouen Youshishuu, November, 2000, page 379, 1PB-185	1-20
A	JP 10-337186 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 22 December, 1998 (22.12.98) (Family: none)	1-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	EP 297379 A2 (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC) 4.1月.1989 (04.01.89) & JP 1-98499 A	1, 7-8/ 2-6, 9-20
X/A	EP 663447 A2 (栄研化学株式会社) 19.7月.1995 (19.07.95) & JP 7-231799 A & US 5849487 A	1-2, 7-8, 10, 15-16/3-6, 9, 11-14, 17-20
X/A	EP 726312 A2 (JOHNSON & JOHNSON CLINICAL DIAGNOSTICS) 14.8月.1996 (14.08.96) & JP 8-173159 A & US 5622822 A	1, 7-8/ 2-6, 9-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.08.01

国際調査報告の発送日

14.08.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	EP 707077 A2 (JOHNSON & JOHNSON CLINICAL DIAGNOSTICS) 17.4 月.1996 (17.04.96) & JP 8-173194 A & US 5582988 A	1, 7-8/ 2-6, 9-20
P, X	森 安善 他、ピロリン酸マグネシウムの沈殿生成を指標としたLAM P法の簡易検出、第23回日本分子生物学会年会プログラム・講演 要旨集、11月.2000、p. 379、1PB-186	1-20
P, Y/ P, A	Tsugunori Notomi et al., Loop-mediated isothermal amplificati -on of DNA, Nucleic Acids Research, Jun. 2000, Vol. 28, No. 12, p. e63	1-8, 10-16, 18-20/9, 17
P, A	長嶺 憲太郎 他、新規核酸増幅法 (LAMP: Loop-mediated isother -mal amplification) の開発、第23回日本分子生物学会年会プロ グラム・講演要旨集、11月.2000、p. 379、1PB-1 85	1-20
A	JP 10-337186 A (栄研化学株式会社) 22.12月.1998 (22.12.98) ファミリーなし	1-20